

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 9/10 // 15/54</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/40706</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月13日(13.07.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/07250</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月24日(24.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/373131 1998年12月28日(28.12.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104-8315 東京都中央区京橋1丁目15番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 横山敬一(YOKOYAMA, Keiichi)(JP/JP) 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) 小野邦夫(ONO, Kunio)(JP/JP) 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 川崎工場内 Kanagawa, (JP) 江島大輔(EJIMA, Daisuke)(JP/JP) 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 医薬研究所内 Kanagawa, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 石田康昌, 外(ISHIDA, Yasumasa et al.) 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目20番12号 望星ビル7階 加藤内外特許事務所 Kanagawa, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING TRANSGLUTAMINASE</p> <p>(54)発明の名称 トランスグルタミナーゼの製造方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Transglutaminase having an enzymatic activity is produced by subjecting transglutaminase which is in a denatured state to a process involving at least the following steps (a) and (b): (a) the step of forming an intermediate structure, which shows the enzymatic activity in an aqueous medium under acidic conditions, of the denatured enzyme in the course of forming the structure; and (b) the step of forming a higher-order structure, which shows the enzyme activity in an aqueous medium at a pH value within the neutral region, of the enzyme having the intermediate structure in the course of forming the structure as described above. Thus, transglutaminase obtained in a denatured state (for example, one produced by a gene recombinant microorganism) can be efficiently refolded and, therefore, highly pure transglutaminase having an enzymatic activity substantially comparable to the activity of authentic transglutaminase (i.e., transglutaminase activity) can be industrially produced. The intermediate having the intermediate structure in the course of forming the structure as described above.</p>		

(57)要約

変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを少なくとも下記 (a) 及び (b) 工程を含む工程に付することにより酵素活性を有するトランスグルタミナーゼを製造する：

(a) 当該変性した状態にある酵素を水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめるようにする工程；及び

(b) 前記構造形成の中間構造を形成した酵素を、水性媒体中 pH 値が中性領域下で酵素活性を有する状態の高次構造を形成せしめるようにする工程。

遺伝子組み換え微生物により生産されるような変性した状態で得られるトランスグルタミナーゼを効率良くリフォールディングすることができ、天然状態のトランスグルタミナーゼと実質的に同等の酵素活性、即ちトランスグルタミナーゼ活性を有する高純度のトランスグルタミナーゼを工業的に製造することができる。

前記構造形成の中間構造を有する中間体も提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルギナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサウ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヴェトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明 細 書

トランスグルタミナーゼの製造方法

技術分野

本発明は新規トランスグルタミナーゼの製造方法、詳しくは変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを、酵素活性を有する状態にリフォールディングして、天然状態にあるものと実質的に同等の活性を有するトランスグルタミナーゼを製造する方法に関する。この方法により、変性した微生物トランスグルタミナーゼを、酵素活性を有する天然状態のものにリフォールディングすることができ、遺伝子組み換え技術を用いて生産した不活性な酵素タンパク質を、大量にかつ安価に高活性な酵素へ変換し、食品加工の分野で広く利用することが可能となる。

背景技術

トランスグルタミナーゼは、ゼリー等のゲル化食品、ヨーグルト、チーズ、或いはゲル状化粧品等の製造や食肉の改質等、更にはこれらの分野以外でも広く利用されており、工業的に極めて有用な酵素である。

トランスグルタミナーゼ (EC 2.3.2.13; TGase) はタンパク質、又はポリペプチド鎖のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と一級アミン間でのアシル転移反応を触媒する酵素であり、そのうち微生物 (*Streptomyces mobaraensis* の variant) の培養上清から見出されたトランスグルタミナーゼを微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) と称する。

MTGは331個のアミノ酸からなる分子量38000の単量体タンパク質である (Journal of Biological Chemistry, 268, 11565-11572, 1993)。本酵素の大量生産を目的として、上記微生物の培養条件の至適化が図られたが (Agricultural Biological Chemistry, 53, 2613-, 1989)、この微生物は従来タンパク質の工業的生産に広く用いられてきたものではなく、生産量や生産コストの面で課題が多かった。また、本酵素は菌体外に活性な状態で分泌されるが、分子内に脱アミド反応による化学的修飾を容易に受ける配列を4カ所有するため、分泌生産が継続

している間に培養液中で化学的修飾が進行し、回収された培養上清には活性が低下した酵素が混合物として蓄積された。これらの問題を解決するために、大腸菌等の微生物を用いた遺伝子組み換えMTG生産法が種々検討された（バイオサイエンスとバイオインダストリー、52、554-561、1994）。

本酵素の配列そのものを大腸菌の菌体内で発現させると、その発現量は微量であったが、高発現の可能なT7 gene 10由来配列の断片と融合させることにより、融合タンパク質の高発現に成功した。しかし、この融合タンパク質を限定分解して得られた本来の配列を有する酵素は、天然状態のトランスグルタミナーゼの約1/5の酵素活性しか示さず、この方法で得られた酵素の高次構造の不完全性が示唆された（Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 830-835, 1997）。また、融合タンパク質から本酵素の配列のみを切り出すには、消化酵素、或いは化学的手段による限定分解が必要であり、製造法の複雑さに加えて、生産コスト高も大きな問題となった。

以上の問題を解決するには、本酵素の配列のみを微生物で直接に高発現する技術を得ること、回収された変性状態の本酵素の高次構造を完全に再形成し、酵素活性を回復する技術（リフォールディング技術）を得ること、が必要であった。先に本出願人は、MTGを大腸菌の菌体内に発現させる際、使用コドンに宿主大腸菌用に変更し、プラスミドのコピー数を大幅に増加させることにより、それまで不可能であった本酵素配列の菌体内高発現に成功し、この内容を発明として特許を出願している（特願平10-181951号、平成10年6月29日出願、特開平11-075876号（平成11年3月23日公開）、その発明を以下「先の発明」という。）。

このような状況下に、優れたリフォールディング方法の開発が求められている。

発明の課題、目的

ところで、タンパク質のリフォールディング技術については、対象とするタンパク質の天然状態を検討してその適正な条件を予測することは不可能であり、実際に対象タンパク質を用いて個々の操作条件を実験的に探索する必要がある（Advances in Protein Chemistry, 50, 1-59, 1997）。先の発明（前記本出願人に

よる特許出願)により、変性した状態にある本酵素を大量に入手可能となり、ここに初めて本酵素リフォールディング技術の検討が可能となった。

本発明の目的は、本酵素の安価な工業的製造法を構築するために、遺伝子組み換え微生物により生産されるような変性した状態で得られた本酵素のリフォールディング方法を開発し、天然状態のトランスグルタミナーゼと実質的に同等の酵素活性(即ちトランスグルタミナーゼ活性)を有するトランスグルタミナーゼを製造する方法を提供することにある。

発明の開示

本発明者等は、上記課題を解決し本発明の目的を達成するために鋭意検討を重ねた結果、変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを少なくとも下記(a)及び(b)工程を含む工程に付することにより酵素活性を有するトランスグルタミナーゼを効率よく製造できることを見出し本発明を完成するに至った:

(a) 当該変性した状態にある酵素を水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめるようにする工程; 及び

(b) 前記構造形成の中間構造を形成した酵素を、水性媒体中pH値が中性領域下で酵素活性を有する状態の高次構造を形成せしめるようにする工程。

即ち、本発明は前記(a)及び(b)工程を少なくとも含有する、特にリフォールディング工程中に含む、トランスグルタミナーゼの製造方法にある。

尚、(a)工程で得られる中間構造を有する酵素は、(a)工程のような処理工程により得られるような、トランスグルタミナーゼ酵素活性を有するが天然に存在するものと比較して実質的に低いものであり、例えば酵素活性が20 U/mg未満の酵素である。

更に、本発明には下記の内容が含まれる。

1. 前記(a)工程において、当該酵素の分子内のシステイン残基のチオール基が遊離形であり、水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめる際に、当該酵素が溶解した状態で酸性下に希釈される上記方法。

システイン残基部分で2分子が結合するようなダイマーの場合、還元してチオール基を遊離形(フリー)にする方が好ましい。

2. 前記 (b) 工程において、水性媒体が酵素活性を有する状態の高次構造を形成する促進剤を含有する上記方法。

(b) 工程においては、中性領域に調整する段階を含むが、この際目的とする高次構造を形成促進する促進剤を使用し、特に好ましくは pH 値を上昇せしめる前に添加して使用するとよい。その場合の促進剤としては、低分子量化合物が好ましく、例えば塩化カルシウム、塩化ストロンチウム等の無機塩、酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム等の有機酸塩、アミノ酸塩、ポリエチレングリコール等のポリオール、DMSO、DMF 等の有機溶媒が適宜採用される。

3. 前記 (b) 工程後に、(c) 当該酵素のうち不活性な酵素を会合凝集物として分離する工程を含む上記方法。

4. 前記 (a) 工程において、当該酵素が当該水性媒体中に溶解しており、(b) 工程において、当該中性領域が当該 (a) 工程で得られた酵素溶液の pH 値を上昇せしめて中性領域とした領域である上記方法。

5. 前記 (a) 工程において、当該変性した状態にある酵素の酸性溶液を酸性下に希釈する際に、低温下、好ましくは 15℃ 以下で希釈され、希釈されたタンパク質濃度が 10 mg/ml 未満である上記方法。

希釈倍率としては 5 倍以上、好ましくは 10 倍以上、より好ましくは 50～400 倍程度であり、複数段階に分けて希釈してもよい。また、希釈に際して下記変性剤を使用する場合、希釈前と希釈後とを変性剤の濃度で示すと尿素の場合は 4～10 M 程度の濃度のものを希釈して 0.01～0.5 M 程度の濃度にするのが好ましい。

(a) 工程は低温下に行うのが好ましく、特に希釈に際して低温下を実施されるのが好ましい。例えば、15℃ 以下、好ましくは 3～10℃ 程度の低温下で実施することができる。

6. 前記 (a) 工程において、水性媒体がタンパク質変性剤を含有する上記方法。

出発物質のトランスグルタミナーゼは水性媒体中良く溶解している方が好ましく、その溶解補助剤としてタンパク変性剤を使用することができる。その場合のタンパク質変性剤として、尿素、塩酸グアニジン、チオシアン酸塩等を挙げるこ

とができる。使用する濃度としては通常タンパク質を変性するのに使用する濃度や、変性剤の種類等にもよるが、例えば尿素を変性剤として使用する場合4～10 M程度で使用する事ができる。希釈する場合は、一度に希釈しても段階的に希釈してもよい。

7. 変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを、水性媒体中酸性下に溶解せしめ、その後当該酵素溶液を中性領域に調整して目的とする前記酵素活性を有する状態にある酵素を生成せしめることによりトランスグルタミナーゼを製造する方法。この場合、好ましい処理条件等については上記の記載を利用して行うことができる。

8. 前記(a)工程で得られる構造形成の中間構造が、近紫外領域のCDスペクトルにおいて天然状態のものに対して30～70%の分子楕円率を有する上記方法。

9. 変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを水性媒体中酸性下におくことにより得ることができ、以下の性質(d)～(g)を示すタンパク質：

(d) ハイドロキサメート法によるトランスグルタミナーゼの活性測定により15～25 U/mgの比活性を有し；

(e) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で36,000～40,000の分子量を有し；

(f) 近紫外領域のCDスペクトルにおいて天然状態のものに対して30～70%の分子楕円率を有し；及び

(g) His-Mes、pH6.1の緩衝液システムで行う native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法において天然状態のものより遅い移動度を示す。

前記SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法では、天然状態のものと同等の値、約38,000の分子量を有するのが好ましい。

尚、トランスグルタミナーゼの活性測定に使用するハイドロキサメート法については、公知方法(例えば、文献：Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 830-835, 1997参照。)により行うことができる。

次に、本発明の好適な例を示す。

下記工程イ、及びロ、の工程を含む、変性した状態にあるトランスグルタミナ

ーゼ（MTG）から酵素活性を有する天然状態のトランスグルタミナーゼのリフォールディング方法による製造：

（イ）活性残基のシステイン残基（Cys）のチオール基が遊離形（フリー）である、変性、可溶化された微生物由来トランスグルタミナーゼ含有液のpH値を酸性領域に調整し、好ましくは希薄な変性剤を含む酸性緩衝液に一挙に、好ましくは50～400倍程度に希釈し、天然状態への構造形成の中間構造（状態）を有する本酵素を得る工程；及び

（ロ）前記構造形成の中間構造（状態）を有する本酵素含有液に直接、或いは構造形成を促進する低分子量化合物を添加した後、アルカリ液を添加してpH値を中性領域、6～7程度にまで上昇せしめ、本酵素の高次構造形成を促進、或いは当該高次構造を形成させるとともに、必要により構造形成に到らない不活性な画分を会合凝集物として分離する工程。

実施の形態

次に、本発明の実施の形態について詳細に説明する。特に、組み換え大腸菌を培養して得られる変性した状態にある酵素を含む培養物から好適な例として具体的にリフォールディングをする場合を中心に説明するが、本発明はこれに限定されることはない。

本発明に使用する出発物質である被処理物は、変性した状態にあるトランスグルタミナーゼ、好ましくは微生物由来の変性トランスグルタミナーゼ（MTG）のように天然状態の高次構造を有さないトランスグルタミナーゼで実質的に酵素活性を示さないもの、更には最終的にトランスグルタミナーゼ活性を発揮し得る配列を有する酵素が本発明の出発物質に含まれる。

より詳細に説明すると、天然状態のトランスグルタミナーゼ配列はN端のアスパラギン酸残基（1番目）から始まりC端のプロリン残基（331番目）に終わる331個のアミノ酸で構成され、そのようなタンパク質は勿論本発明の出発物質に含まれる。その他2番目から331番目のアミノ酸残基を有する330のアミノ酸（1番目のアスパラギン酸残基が欠失している。）で構成されるタンパク質や、それらに更に、N端側及び／又はC端側にアミノ酸残基が1個又は複数個配列して結合するタンパク質であってトランスグルタミナーゼ活性を実質的に示

さないがその高次構造の転移により当該活性を有し、又は有する可能性のあるものが含まれる。このようなタンパク質のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加若しくは挿入されたアミノ酸配列であって、本発明の方法によりトランスグルタミナーゼ活性を有し、又は有する可能性のある配列を持つタンパク質は本発明の出発物質に含まれる。

本発明で用いる出発物質の代表的な例としては、微生物由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子を組み込んだ微生物、例えば組み換え大腸菌を培養して得られる変性酵素を含む培養物を挙げることができる（先の発明：前記本出願人による特許先願、後述の実施例中の製造例参照）。ここで、微生物由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子の一部が変化し、発現されるアミノ酸配列の一部が、その1カ所又は複数カ所において欠損及び／又は置換（1個又は複数個のアミノ酸残基で）されたり、並びに／又は1個又は複数のアミノ酸で付加、挿入されたりしても、最終的にトランスグルタミナーゼ活性を発揮し得る配列であれば、本発明に使用する出発物質として使用できる。

大腸菌を生産宿主として用いた場合、微生物由来トランスグルタミナーゼの殆どは菌体中に不溶性顆粒として蓄積されるので、この顆粒を出発物質とすることができる。その場合、常法に従って回収された微生物由来トランスグルタミナーゼの不溶性顆粒を水性媒体中好ましくは可溶化せしめる。その際、1 mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA）水溶液に懸濁後、尿素、塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤を用いて可溶化するとよい。その他可溶化するための変性剤としては、チオシアン酸塩等を挙げるができる。

尿素濃度と塩酸グアニジン濃度は、一般にタンパク質を変性するのに必要なそれぞれ7 ~ 10 M、4 ~ 7 M程度でよい。微生物由来トランスグルタミナーゼの濃度には特に制限がないが、できるだけ高濃度、例えば10 ~ 100 mg/ml程度にするのが以降の操作上好ましい。

このような水溶液に、例えばダイマーに見られるようなジスルフィド結合について還元をする場合には還元剤を添加するのが好ましい。その場合、その水溶液に直ちに、還元剤、例えばジチオスレイトール（DTT）を20 mMになるよう添加し、pH値を7.5に調整後、37℃で約2時間攪拌して可溶化するとよい。

次いで、このようにして得られた微生物由来トランスグルタミナーゼの可溶性液に塩酸等の酸を適量添加してpH値を、2～7、より好ましくは3～5、更に好ましくは3.5～4.5程度に調整し、同じ濃度の変性剤と還元剤を含む同じ又は同程度のpH値の緩衝液を用いて希釈し、濃度を、10～100 mg/ml、より好ましくは20～80 mg/ml程度に調整する。このような酸性下での希釈操作が前記高次構造の形成を促進する上で好ましい。処理温度は低温である方が好ましく、0～15℃、好ましくは3～10℃程度で処理するとよい。

上記に得られた溶液を予め3～10℃に冷却しておいた5～50 mM、好ましくは15～25 mMの酢酸ナトリウム、pH 3～5、好ましくは3.5～4.5の緩衝液中に希釈して、タンパク質濃度を0.2～4 mg/ml、尿素濃度を0.01～0.5 Mに調整することにより、変性酵素を構造形成の中間構造（状態）へと導くことができる。この中間状態は、溶媒環境を整え、酸性下で希釈することによって初めて効果的に観察される速度論的な中間状態であり、天然状態から平衡的に容易に導かれる状態ではない（後述の実施例11～16参照。）。

変性酵素の希釈は他段階に分けて行うこともできるが、全体での希釈倍率としては、好ましくは50～400倍程度であり、変性剤を使用する場合、変性剤の濃度で示すと尿素の場合4～10 M程度のものを希釈して0.01～0.5 M程度にするとよい。

尚、上記酸性下での希釈に際して、リフォールディングに適した前記構造形成の中間構造（中間状態）を獲得するには長時間、例えば0.5時間以上、好ましくは1時間以上、より好ましくは1.5時間以上保持するのが望ましい。

このようにして形成される中間構造（状態）については、後述実施例11～16に示される通り天然構造（状態）とは異なり、本発明において好ましい希釈条件を選択することにより“天然状態”のトランスグルタミナーゼを効率よく取得することができる。

中間状態の形成は、例えばVydac 214TP54 (4.6φ x 250 mm、SEPARATIONS GROUP) を用いる逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と、例えばSuperdex-75 HR 10/30 (10 φ x 300 mm、アマシャム・ファルマシア・バイオテック) を用いる高速ゲルろ過クロマトグラフィーのそれぞれで検出される、微生物由来トランス

グルタミナーゼのピークエリアを比較検討することにより確認することができる。ここで、文献 (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 830-835, 1997) に記載の方法で測定された中間状態の酵素活性は低く、例えば比活性として10 ~ 20 U/mg程度であり、天然状態の酵素活性 (約30 U/mg) を大きく下まわる。このような酵素活性を含むもの又はその画分を本発明における (a) 工程で得られる「構造形成の中間構造」を有する酵素に含まれる。従って、このような低い酵素活性を有するMTGが生成した段階で (その採取工程を含むことなく) 本発明における (a) 工程が終了する。

上記の希釈法に代えて、ゲルろ過クロマトグラフィーや透析により中間 (状態) を形成することも可能であるが、希釈法に比較して酵素タンパク質の回収率や酵素活性 (比活性) の低下を招くので、好ましくない。尚、前記低い酵素活性が得られれば、特に本発明においては (a) 工程における酵素を分離する必要はなく (b) 工程に付すことができる。

続いて、(b) 工程においては前記の如くして得られたような中間状態を形成した酵素を含む溶液をpH値が中性領域で処理するとよい。この場合そのような酵素の液を低温下、例えば15℃以下、好ましくは3 ~ 10℃に維持したまま、pH値を上昇せしめて中性領域にすることができる。中性領域を調製する方法として好ましくは、これにアルカリ液を添加し、pH値を5.8 ~ 8.5、好ましくは6 ~ 7に上昇し、生じた沈殿を遠心分離して除去することにより、構造形成を完了した微生物由来トランスグルタミナーゼのみを含む上清を回収できる。従って、この方法によれば上記構造形成を成し得なかった活性を有さない酵素は会合凝集物として容易に分離できるので、極めて有利である。上記目的とする酵素活性を有する構造形成が一部でも得られた段階で (採取工程を含むことなく) 本発明における (b) 工程は終了する。

上清の酵素活性は約30 U/mgと天然状態と同等にまで高まり、各種HPLCにおける溶出ピークプロファイル、分光学的性質、及び熱安定性は天然状態の微生物由来トランスグルタミナーゼと完全に、又は実質的に一致する。以上より、変性タンパク質から天然状態の酵素へのリフォールディングが完了したことが分かる。尚、酵素の分離、精製工程はトランスグルタミナーゼその他酵素の分離、精製方

法として知られている方法を利用すれば容易に行うことができる。

また、中間状態のpH値を上昇する際、予めここへ促進剤として低分子量化合物を添加しておくことにより、中間状態から天然状態への構造形成を促進することができる。例えば、0.01 ~ 10 mMの塩化カルシウム (CaCl_2) 等の2価の金属塩は、中間状態に対して構造転移の核となる局所的な構造形成を促進し、天然状態への転移を促進すると考えられる。また、塩化カルシウム以外で塩化ストロンチウム等の無機塩を採用することができる。更に、0.1 ~ 2 Mの酢酸ナトリウムやプロピオン酸ナトリウム等の有機酸塩、0.1 ~ 2 Mのアルギニン塩酸塩等のアミノ酸塩、10 ~ 40 %のジメチルスルホキシド (DMSO) やジメチルホルムアミド (DMF) 等の有機溶媒、1 ~ 10 %のポリエチレングリコール等のポリオールや1 ~ 50 mMのCHAPS等の界面活性剤は、緩衝液の性質を変えることにより天然状態への構造転移の過程で生じる酵素の会合凝集を抑制し、本酵素タンパク質の回収率を向上するものと考えられる。

このように生成して得られたトランスグルタミナーゼは極めて高純度であり、これを分離し、単離するには特に困難は無く、酵素 (トランスグルタミナーゼ) の単離方法として慣用又は知られている方法を利用して容易に行うことができる。

このように本発明において得られるトランスグルタミナーゼは天然状態にあるものと実質的に同等の活性を有し、かつ極めて高純度であるため、更に精製する必要がなく、そのまま食品等各種の分野で、天然状態のトランスグルタミナーゼと同様に使用することができる。

図面の簡単な説明

[図1]

MTG発現プラスミド pTRPMTG-01 の構築図である。

[図2]

MTG発現プラスミド pTRPMTG-02 の構築図である。

[図3]

MTGが発現したことを示すSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の展開図で

ある。

1. MTG (4 μ g)
2. pUC19/JM109の菌体破碎全画分 (ネガコン)
3. pUCTRPMTG-02/JM109の菌体破碎全画分
4. 第3レーンの遠心上清画分
5. 第3レーンの遠心沈殿画分

[図4]

プラスミドpUCN216Dの構築図である。

[図5]

MTG発現プラスミドpUCTRPMTG (+) D2の構築図である。

[図6]

アスパラギン酸残基に相当するGATが欠失したことを示す図である。

[図7]

N末端アミノ酸がセリンであることを示す図である。

[図8]

天然状態のトランスグルタミナーゼ (天然型) と遺伝子組み換えMTGから得られたもの (遺伝子組み換え型) の逆相HPLCを示す図である。

1 : 遺伝子組み換え型 ; 2 : 天然型

各々、即ち天然型、遺伝子組み換え型のトランスグルタミナーゼ、それぞれ8 μ gを以下の条件による逆相HPLCに供した。

カラム : Vydac 214TP5410

溶離液 : A : 0.1% TFA (トリフルオロ酢酸)

B : 0.1% TFA、80% アセトニトリル

溶出プログラム：1 ml / 分

時間 (分)	A (%)	B (%)
0	70	30
20	50	50
25	0	100
28	0	100

[図9]

トランスグルタミナーゼの天然状態のもの（天然型）及び遺伝子組み換えMTGから得られたものの（遺伝子組み換え型）CDスペクトルを示す図である。

AVIVモデル62ADS（HART SCIENTIFIC製）と1mmセルを用い、20℃で実施例1中の4検体のCDスペクトルを測定した。図中の検体番号1～4は下記の通りである。

検体番号	トランスグルタミナーゼ	緩衝液pH値	トランスグルタミナーゼ濃度
1	天然型	4.0	3.22 mg/ml
2	天然型	5.8	3.20
3	遺伝子組み換え型	4.0	1.81
4	遺伝子組み換え型	5.8	1.69

[図10]

実施例12で得られた遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼの天然型、及び構造形成途中の中間構造（状態）のCD（円偏光二色性）スペクトルを示す図である。

1. 希釈後0-10min；
2. 希釈後10-60min；
3. 希釈後60-160min；
4. 希釈後170-270min；及び
5. 精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼ。

[図11]

実施例12で得られた遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼの天然型、及び構造形成途中の中間状態のCDスペクトルを示す図である。

1. 精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼ；
2. 精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼをpH4.2、0.16M尿素に調整したもの；及び
3. 変性状態から希釈後、26時間経過したもの。

[図12]

実施例13で得られた遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼの天然型、及び構造形成途中の中間構造（状態）についてゲル濾過分析のクロマトグラムを示す図である。

[図13]

実施例16で得られた遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼの天然型、及び構造形成途中の中間状態についてNative PAGEの結果を示す図である。

1. 精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼ；
2. 変性状態から希釈後、26時間経過したもの；
3. 精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼをpH4.2、0.16M尿素に調整したもの；及び
4. 3に同じ。

好適な実施の形態

以下、製造例及び実施例により本発明を具体的に説明する。

(出発物質の製造例)

微生物由来トランスグルタミナーゼをコードするDNAを導入した大腸菌を2xYT培地で培養し、微生物由来トランスグルタミナーゼを不溶性顆粒として菌体内に蓄積させたものを出発物質として使用すべく下記のように調製した。尚、この詳細な内容については前記先の発明について本出願人による特願平10-181951号、平成10年6月29日出願、特開平11-075876号公報（平成11年3月23日公開）（明細書等）に記載されており、この明細書等の内容が参考により本願明細書の中に組み込まれる。

MTGは、菌体内に不溶性顆粒として蓄積するので、下記のように菌体破碎液の遠心沈殿画分に含まれ、以後の実施例では、この遠心沈殿画分を顆粒として用いた。尚、この顆粒はトランスグルタミナーゼ活性は示さなかった。

E. coliにおけるMTGの大量発現

(1) MTG発現プラスミドpTRPMTG-01の構築

MTG遺伝子は、E. coliや酵母のコドン使用頻度を考慮して、既に、全合成されている（特開平5-199883号公報参照）。しかしながら、この遺伝子配列は、E. coliでの発現に最適なものになっていなかった。即ち、30個存在するアルギニン残基のコドンが全てマイナーコドンであるAGAであった。そこで、まず、MTG遺伝子のN末端から約200塩基をE. coliの発現に最適なように再合成することとした。

MTG遺伝子を転写するプロモーターは、培地中のトリプトファンの欠乏で容易に転写が誘導されるtrp プロモーターを用いることとした。マダイ・トランスグルタミナーゼ（TG）遺伝子を高発現したプラスミドpTTG2-22（特開平6-225775号公報参照）は、trp プロモーターを用いており、マダイTG遺伝子上流の配列は、E. coliにおいて異種タンパク質が高発現するようにデザインされている。

pTRPMTG-01の構築には、図1に示したようにマダイTG発現プラスミドpTTG2-22（特開平6-225775号公報参照）のtrp プロモーター下流にあるClaI部位から下流のBglII 部位までを合成DNA遺伝子ClaI/HpaI 断片とpGEM15BTG（特開平6-30771号公報参照。）のHpaI/BamHI断片（小）に置き換えることによって構築した。

合成DNA遺伝子ClaI/HpaI 断片は、pTTG2-22のtrp プロモーター下流のClaI 部位から翻訳開始コドンまでの配列とMTG遺伝子のN末端から216塩基を持つ遺伝子配列である。MTG構造遺伝子部分に関しては、E. coliの発現に最適なようにE. coliのコドン使用頻度を参考にして塩基配列を決定した。但し、mRNAの高次構造形成を除去するためN末端部分をコードする領域中の縮重コドンの3文字目をアデニン、ウラシルに富むコドンへ変換し、できるだけ同じ塩基が続かないよう配慮した。

合成DNA遺伝子ClaI/HpaI 断片は、末端にEcoRI、HindIII を持つようにデザインした。デザインした遺伝子を+鎖と-鎖が互いにオーバーラップするように約40～50塩基に分割し、各々の配列に相当するDNAを12本合成した（配列表配列番号2から13）。この合成DNAの5'末端をリン酸化し、ペアになる合

成DNAをアニーリング後、連結した。その後、アクリルアミドゲル電気泳動を行い、目的の大きさのDNAを切り出し、pUC19 のEcoRI/HindIII 部位に組み込んだ。塩基配列を確認し、正しいものをpUCN216 と名付けた。このpUCN216 から、ClaI/HpaI 断片（小）を切り出し、pTRPMTG-01の構築に用いた。

〈2〉MTG発現プラスミドpTRPMTG-02の構築

pTRPMTG-01を保持するE. coli JM109は、MTGを高発現しなかったため、MTG遺伝子のN末端の改変した部分以外の部分（777 塩基）も、E. coli用に改変することとした。777 塩基を一度に合成するのは難しいので、E. coliのコドン使用頻度を参考にして塩基配列を決定した後、約200 塩基ずつ4つのブロック（B 1, 2, 3, 4）に分けて合成することとした。各ブロックは、末端にEcoRI、HindIII を持つようにデザインした。デザインした遺伝子を＋鎖と－鎖がお互いにオーバーラップするように約40～50塩基に分割し、各々の配列に相当するDNA を各ブロック10本ずつ計40本合成した（配列表配列番号14から53）。この合成DNAの5'末端をリン酸化し、ペアになる合成DNAをアニーリング後、連結した。その後、アクリルアミドゲル電気泳動を行い、目的の大きさのDNAを切り出し、pUC19 のEcoRI/HindIII 部位に組み込んだ。塩基配列を確認し、正しいものをそれぞれpUCB1, B2, B3, B4と名付けた。次に、図2に示すように、B1とB2、B3とB4を連結したpUCB1-2、pUCB3-4を作製し、更にpTRPMTG-01、pUCN216、pUCB1-2、pUCB3-4より、pTRPMTG-02を構築した。pTRPMTG-02上に存在する高発現MTG遺伝子を含む塩基配列を配列表配列番号1に示す。

〈3〉MTG発現プラスミドpUCTRPMTG-02（+）、（-）の構築

このpTRPMTG-02を保持するE. coli JM109も、MTGを高発現しなかったため、プラスミドを多コピー化することとした。pTRPMTG-02のtrp プロモーターを含むEco0109I断片（小）を平滑化後、多コピープラスミドであるpUC19 のHincII部位に組み込み、lacZのプロモーターとtrp プロモーターが同一のもの（pUCTRPMTG-02（+））と逆向きのもの（pUCTRPMTG-02（-））を構築した。

〈4〉MTGの発現

pUCTRPMTG-02（+）、pUC19 で形質転換したE. coli JM109を、150 μ g/mlのアンプシリンを含む3mlの2 x YT培地で、37℃、10時間振盪培養した（前培

養)。この前培養液0.5ml を150 μ g/mlのアンピシリンを含む50mlの2 x Y T培地に添加し、37℃、20時間振盪培養した。

培養液から、菌体を集菌し、超音波破碎した。この菌体破碎液の全画分、遠心上清画分、遠心沈殿画分をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて展開した結果を図3に示す。pUCTRPMTG-02 (+)/JM109 の菌体破碎全画分、遠心沈殿画分にMTGと同一分子量を有するタンパク質の高発現が確認された。また、ウエスタンブロッティングによって、このタンパク質がマウス抗MTG抗体と反応することが確認された。このタンパク質の発現量は500 ~600mg/L であった。なお、生産培地には、3- β -インドールアクリル酸を加えなくとも、十分な高発現が見られた。

更に、マウス抗MTG抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、遠心上清画分にはMTGがわずかししか発現しておらず、発現したMTGは殆ど全て不溶性タンパク質封入体となっていることが分かった。

〈5〉発現MTGのN末端アミノ酸の解析

発現したMTGのタンパク質封入体についてN末端アミノ酸残基の解析を行ったところ、N末端の配列は約60%がメチオニン残基で約40%がフォルミルメチオニン残基であった。開始コドンに相当する(ホルミル)メチオニン残基を除去するため、以下のような工夫を行った。

〈6〉MTGのN末端アスパラギン酸残基の欠失

MTGのN末端に相当する216塩基を含むpUCN216を鋳型として、PCRを行うことによって、アスパラギン酸残基に相当する塩基配列を欠失させた。pUCN216は、MTGのN末のClaI-HpaI断片を含む約216bpがpUC19のEcoRI/HindIII部位にクローニングされたプラスミドである。pF01(配列表配列番号54)、pR01(配列表配列番号55)はベクター中の配列を持つプライマーであり、pDELD(配列表配列番号56)はAsp残基に相当する塩基配列を欠失させたもの、pHd01(配列表配列番号57)はCをGに変えてHindIII部位を潰したものである。pF01、pDELDはセンスプライマー、pR01、pHd01はアンチセンスプライマーである。

まず、pF01とpHd01、pDELDとpR01の組み合わせでpUCN216に対して、それぞ

れPCR を94℃で30秒、55℃で1 分、72℃で2 分の条件で35サイクル行った。各PCR 産物をフェノール/クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿を行い、100 μ L のH₂O に溶解した。

各PCR 産物から1 μ L ずつ取って混ぜ94℃で10分間熱変性した後、pF01とpHd01 のプライマーの組み合わせで、PCR を94℃で30秒、55℃で1 分、72℃で2 分の条件で35サイクル行った。

2 回目のPCR 産物をフェノール/クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿したものを、HindIII 、EcoRI 処理をし、pUC19 サブクローニングしpUCN216Dを得た(図4)。得られたpUCN216Dのシーケンスを確認したところ目的通りのものであった。

〈7〉アスパラギン酸残基欠失プラスミドの構築

pUCN216DのEco0109I/HpaI 断片(小)を、pUCB1-2 (MTG 遺伝子のHpaI/BglII断片がpUC19 のEcoRI/HindIII 部位にクローニングされたプラスミド)のEco0109I/HpaI 断片(大)と結合し、pUCNB1-2D とした。更に、pUCNB1-2D のClaI/BglII断片(小)を、MTG 高発現プラスミドであるpUCTRPMTG-02 (+) のClaI/BglII断片(大)と結合し、アスパラギン酸残基除去MTG 発現プラスミドpUCTRPMTG (+)D2とした(図5)。その結果、図6に示すように、アスパラギン酸残基に相当するGAT が欠失したMTG 遺伝子を含むプラスミドを得た。

〈8〉アスパラギン酸残基欠失MTG の発現

pUCTRPMTG (+)D2 で形質転換したE. coli JM109を、150 μ g/mlのアンピシリンを含む3 mlの2 x YT培地で、37℃、10時間振盪培養した(前培養)。この前培養液0.5ml を150 μ g/mlのアンピシリンを含む50mlの2 x YT培地に添加し、37℃、20時間振盪培養した。菌体を超音波破碎した後の破碎上清及び沈殿の、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクマシー・ブリリアント・ブルー染色やマウス抗MTG抗体を用いたウェスタン・ブロッティングの結果から、超音波破碎後沈殿即ち不溶画分にアスパラギン酸残基欠失MTGタンパク質が検出された。これは、アスパラギン酸残基欠失MTGタンパク質がタンパク質封入体として菌体内に蓄積したことを示している。

また、このタンパク質封入体についてN末端アミノ酸配列の解析を行ったとこ

ろ、図7に示すように、N末端の配列の約90%がセリンであった。

〈5〉と〈8〉で得られた発現MTGのN末端アミノ酸についての結果を比較すると、表1のようになり、MTGのN末端アスパラギン酸残基を欠失させることにより、発現MTGのN末端に付加される開始メチオニンが効率的に除去されることが分かった。

[表1]

表1

菌 株 名	末端アミノ酸			
	f-Met	Met	Asp	Ser
pUCTRPMTG-02(+)/JM109	40 %	60 %	N.D.	—
pUCTRPMTG(+)/D2/JM109	N.D.	10 %	—	90 %

N.D. : 検出できず。

(実施例1)

前記出発物質の製造例のようにして調製された顆粒（前記遠心沈殿画分）を用いて顆粒懸濁液（1 mM EDTA）を調製、尿素を最終的に8 Mになるよう添加、更に20 mM DTTを添加した後、20 mM リン酸緩衝液でpH 7.5に調整し、37 °Cで2時間攪拌抽出して変性酵素液とした。変性酵素の含有量を前述の逆相HPLCで測定した後、以降の実験に用いるまで、小分けして-80 °Cに凍結保存した。

変性酵素液（酵素の濃度：約50 mg/ml）に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20mMジチオスレイトール（DTT）を含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0）、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml；尿素濃度、0.04 Mとなった。文献（Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 830-835, 1997）に記載のハイドロキサメート法により求めた反応溶液中の酵素活性（比活性）は19.4 U/mgであった。5 °Cで攪拌を30分間継続し、続けて4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性はpH値上昇前の1

.5 倍に上昇して29.0 U/mgに達し、天然状態の微生物由来トランスグルタミナーゼとほぼ一致した。変性酵素からのタンパク質回収率は53.6 %であった。

以上のリフォールディング反応条件を維持したまま、実験スケールのみを10倍に向上し、500 mlの緩衝液を用いて希釈、pH 6.0に上昇後、遠心分離して上清を得た。この酵素の比活性は33.7 U/mg、変性酵素液からのタンパク質回収率は41.9 %であった。この酵素液を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、得られた精製酵素の性状を(1) 逆相HPLC (図8参照)、(2) CDスペクトル (図9参照) 及び(3) 示差走査熱量計 (DSC) を用いて、天然状態の微生物由来トランスグルタミナーゼと比較したところ、両者に実質的な差異は認められなかった。

(実施例2)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を0.2 mg/mlに調整した。この変性酵素液の6 mlを、2 mM DTTを含有する20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0緩衝液に平衡化されたセファデックスG-25Mカラム (1.6 ϕ x 15 cm、アマシャム・ファルマシア・バイオテック) に負荷し、同じ緩衝液で展開した。波長280 nmでのUV吸収を指標にタンパク質画分を回収した。クロマトグラフィーは室温で実施した。回収画分を5 $^{\circ}$ Cに30分以上冷却し、そのまま4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。この酵素の比活性は23.4 U/mg、変性酵素液からのタンパク質回収率は39.8 %となり、実施例1で得られた酵素の比活性、タンパク質回収率の何れよりも低下した。

(実施例3)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を0.2 mg/mlに調整した。この変性酵素液の1 mlを透析膜 (Spectra/Por membrane, No1; Spectrum Medical Industries, Inc.) に注入し、1000 mlの緩衝液 (2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0) に対して、5 $^{\circ}$ Cで終夜透析した。得られた透析内液に4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。この酵素の比活性は31.1 U/mg、変性酵

素液からのタンパク質回収率は42.6 %となり、実施例1で得られたタンパク質回収率よりも低下した。

(実施例4)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 6.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0）、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml；尿素濃度、0.04 Mとなった。5 °Cで攪拌を30 分間継続し、遠心分離して上清を得た。上清にはタンパク質は全く検出されず、リフォールディングに供した変性酵素は全て会合凝集した。

更に、実施例1と同様に調製された変性酵素液に4 M 水酸化ナトリウムを滴下し、pH 9.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 9.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20 mM トリス塩酸塩、pH 9.0）、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。この時のタンパク質回収率は18.9 %であったが、酵素活性は全く検出されなかった。続けて濃塩酸を滴下してpH値を6.0まで下げ、遠心分離して上清を得た。上清にはタンパク質は全く検出されず、リフォールディングに供した変性酵素は全て会合凝集した。

以上の結果は実施例1の有効性と共に、希釈操作を行う際のpH値は酸性に保たなければならないことを示している。

(実施例5)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0）、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5 °Cで攪拌を30分間継続し、再びpH 4.0の変性酵素液（40 mg/ml）を0.25 ml、希釈注入した。この操作を更に2回繰り返し、合計4回に分割して希釈を行った結果、最終的な反応条件は、変性酵素濃度、0

.78 mg/ml ; 尿素濃度、0.16 Mとなった。5 °Cで攪拌を30 分間継続し、続けて4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は32.8 U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は59.0 %となった。希釈操作を分割することなく、1 mlの変性酵素液 (pH 4.0、40 mg/ml) を一挙に希釈注入した場合、得られた上清の比活性は同等であったが (32.8 U/mg)、タンパク質回収率は4分割して希釈した場合より3 %低下して56 %となった。

(実施例6)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液 (2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0)、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5 °Cで攪拌を30 分間継続し、CaCl₂を1 mMになるように添加し、再び5 °Cで30 分間攪拌した。この時の反応条件は、変性酵素濃度、0.2 mg/ml ; 尿素濃度、0.04 M ; CaCl₂濃度、1 mMとなった。続けて4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は30.0 U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は60.1 %となった。対照としてCaCl₂を添加しないリフォールディングを同時に行ったところ、得られた酵素の比活性は31.7 U/mgと同等なものの、変性酵素液からタンパク質回収率は51.3 %と約9 %の差異を示し、pH値を6.0へ上昇する前にCaCl₂を添加する効果を確認できた。一方、希釈用緩衝液に予めCaCl₂を1 mM添加しておくと、比活性は25.3 U/mg、タンパク質回収率は53.2 %と、pH値上昇前に加えた場合より何れも低下した。

(実施例7)

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5 °Cに冷却しておいた希釈用緩衝液 (2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0) 50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5 °Cで攪拌を30分間継続し、SnCl₂を0.1 mM

になるように添加し、再び5℃で30分間攪拌した。この時の反応条件は、変性酵素濃度0.2 mg/ml；尿素濃度0.04 M；及びStCl₂濃度0.1 mMとなった。続けて、4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は27.3 U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は84.5 %となり、実施例1のタンパク質回収率（53.6 %）と比較して大幅に向上した。

（実施例8）

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0に調整した。これを8 M 尿素と20 mM DTTを含む20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この0.25 mlを、予め5℃に冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0）、50 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5℃で攪拌を30分間継続し、界面活性剤であるCHAPS（3-[(3-Cholamidoisopropyl)dimethyl-ammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate）を10 mMになるように添加し、再び5℃で30分間攪拌した。この時の反応条件は、変性酵素濃度0.2 mg/ml；尿素濃度0.04 M；及びCHAPS濃度10 mMとなった。続けて、4 M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0まで上昇し、遠心分離して上清を得た。得られた酵素の比活性は29.3U/mg、変性酵素液からタンパク質回収率は93.0%となり、実施例1のタンパク質回収率（53.6 %）と比較して大幅に向上した。

（実施例9）

実施例1と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH4.0に調整した。これを8M 尿素と20mM DTTを含む20mM リン酸ナトリウム、pH4.0で希釈し、変性酵素濃度を40mg/mlに調整した。この溶液0.2mlを、予め5℃に冷却しておいた希釈用緩衝液（2mM DTTを含む20mM 酢酸ナトリウム、pH4.0）10mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5℃で攪拌を継続しながら、30秒、5分、並びに0.5、1.0、1.5、2.0、3.0及び17時間後に、それぞれ1mlをサンプリングし、直ちに4M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0までシフトし、遠心分離して上清を得た。得られた上清中の酵素の比活性及び変性酵素液から上清までのタンパク質回収率とサンプリングまでの時間との関係を表2に示した。この結果、希

釈直後ではpHシフト後の比活性が低い、サンプリングまでの時間が長くなるに従って、pHシフト後の上清中の比活性が高くなり、1.5時間以上で30U/mgに達した。pH4.0の希釈により形成された中間構造（状態）がリフォールディングに適した構造状態を獲得するのに、より好ましくは1.5時間以上の時間を要することが分かった。

[表 2]

保持時間	比活性 (U/mg)	タンパク質回収率 (%)
30S	13.6	54.0
5min	15.7	50.8
0.5h	24.1	43.8
1.0h	27.1	50.5
1.5h	30.6	50.2
2.0h	30.1	54.5
3.0h	31.1	54.9
17h	29.7	58.5

(実施例 10)

実施例 1 と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH値を4.0に調整した。これを8M 尿素と20mM DTTを含む20mM リン酸ナトリウム、pH4.0で希釈し、変性酵素濃度を40mg/mlに調整した。この溶液0.2mlを、予め5℃に冷却しておいた各種pH値を有する希釈用緩衝液（2mM DTTを含む20mM 酢酸ナトリウム、pH3.5、3.8、4.0、4.2、4.5、5.0及び5.5）10mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5℃で攪拌を2時間継続し、続けて4M 水酸化ナトリウムを滴下してpH値を6.0までシフトし、遠心分離して上清を得た。得られた上清中の酵素の比活性及び変性酵素液から上清までのタンパク質回収率と希釈時のpH値との関係を表3に示した。この結果、pH4.0及びpH4.2で最も高い比活性とタンパク質回収率が得られた。

[表 3]

希釈 pH	比活性 (U/mg)	タンパク質回収率 (%)
3.5	18.0	34.0
3.8	26.1	51.2
4.0	30.8	60.3
4.2	31.1	59.5
4.5	27.8	51.3
5.0	22.1	41.1
5.5	20.6	27.2

(実施例 11)

実施例 1 と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH4.0に調整した。これを8M 尿素と20 mM DTTを含む20mM リン酸ナトリウム、pH4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。この溶液147 mlを、予め5℃に冷却しておいた希釈用緩衝液（2 mM DTTを含む20mM酢酸ナトリウム、pH4.1）7350 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。5℃で攪拌を2時間継続し、続けて4M 水酸化ナトリウムを滴下してpHを6.0までシフトし、デカンテーションと遠心分離により上清を得た。得られた上清中の酵素の比活性は30.7U/mg、変性酵素液から上清までのタンパク質回収率は66.5 %となった。この上清を限外ろ過（ハイドロザルト、10 kDa モレキュラーカットオフ；ザルトコンスライスカセット、ザルトリウス社製）によって750mlまで濃縮し、陽イオン交換クロマトグラフィーの平衡化用緩衝液（20mM 酢酸ナトリウム、pH5.8）で10倍に希釈した。次に、同緩衝液で十分平衡化された陽イオン交換カラム（CMセファロースFF、11.3 ϕ x 10 cm；アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）に負荷した。同緩衝液で再平衡化後、波長280nmでのUV吸収を指標に0→0.3M NaClの直線濃度勾配により溶出されるタンパク質画分（500ml）を回収した。クロマトグラフィーは室温で実施した。この操作により、菌体由来の非タンパク性の不純物が除去できた。

回収画分の半量（250ml）を、2mM DTTを含有する20mM リン酸ナトリウム、pH6.0緩衝液に平衡化されたゲル濾過カラム（セファデックスG-25M、14φ×15cm；アマシャム・ファルマシア・バイオテク）に負荷し、同緩衝液で展開した。波長280 nmでのUV吸収を指標にタンパク質画分（380ml）を回収した。クロマトグラフィーは室温で実施した。得られたタンパク質画分の比活性は29.4U/mg（約0.75g）であった。この画分を1.2mg/mlに濃度調整し、小分けにして-80℃に凍結保存した。以降、この保存サンプルを「精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼ」と称する。

一方、前記陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて残る半量の回収画分（250ml）を、2mM DTTを含有する10 mM 酢酸アンモニウム、pH6.0緩衝液に平衡化された前述のゲルろ過カラムに負荷し、同緩衝液で展開した。波長280nmでのUV吸収を指標にタンパク質画分（380ml）を回収した。クロマトグラフィーは室温で実施した。得られたタンパク質画分の全量を前述の限外ろ過を用いて122mlまで濃縮した。これを、酢酸アンモニウム濃度が最終的に50mMになるよう調整し、-80℃で凍結後、凍結乾燥を行い、約0.75gのパウダーを得た。以降、このパウダーを「精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼパウダー」と称する。

（実施例12）

実施例11で得られた精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼパウダーを用い、構造形成の中間構造（状態）の物理化学的性質を調べた。このパウダーを1mM EDTA水溶液に溶解し、尿素、DTT及びリン酸ナトリウムを、最終的にそれぞれ8M、20mM及び20mMになるよう添加し、pH値を7.5に調整した。これを37℃で2時間インキュベートし、ここへ濃塩酸を滴下してpH4.0に調整した。これを8M 尿素と20mM DTTを含む20mM リン酸ナトリウム、pH4.0で希釈し、変性酵素濃度を40 mg/mlに調整した。以降の実験に用いるまで小分けして-80℃に凍結保存した。この変性酵素液を融解後、この溶液0.2 mlを希釈用緩衝液（2mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH4.0）10 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。その後のnearUVスペクトルを経時的に測定した。測定には、JascoJ-715spectropolarimeterを使用し、キュベットはnearUV領域では1cmパスのものを、farUV領域は0.1cmパスのものを使用した。測定は室温で行い、波長スキャン率

は10nm/minで行った。得られたデータは、アミノ酸1モル当たりのCD（円偏光二色性）シグナルに変換した。図10にnearUVのCD（円偏光二色性）スペクトルを示す。0～10minは、1回のスキンのデータ、10～60minは5回のスキンの平均データ、60～160minと170～270minは、10回のスキンの平均データである。この結果より、希釈直後には殆ど高次構造を形成しておらず、その後ゆっくりと構造形成が進行することが分かった。60～160minと170～270minがほぼ同じスペクトルを示すことから、nearUV-CDで観察される高次構造形成は、遅くとも160minまでに終了していることが分かった。希釈後26時間（h）経過しても60～160minで形成された構造からなんら変化することはない。

同時に、実施例11で得られた精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼに尿素と酢酸ナトリウムを添加し、最終的に0.16M尿素と2mM DTTを含む20mM酢酸ナトリウム、pH4.2に調整し、24時間静置して同緩衝液中で十分に安定な構造を形成させた後、同様にCDスペクトルを測定して天然状態のそれと比較した。その結果を図11に示した。0.16M尿素、pH4.2中であっても、本酵素は天然構造（状態）を失うことはなかった。一方、変性状態から希釈することにより形成された構造状態（希釈後26時間）は、同じ緩衝液中にある本酵素の構造状態（天然状態）とは明らかに異なり、変性→希釈操作（リフォールディング）で形成された構造状態が天然状態とは異なる“中間状態”にあり、しかも希釈後に状態が徐々に変化していることが分かった。

以上から、近紫外領域、特に260～290nmのCDスペクトルにおいて中間状態の分子楕円率は天然状態のものに対して30～70%を示すことが分かった。）

（実施例13）

実施例12と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH4.0に調整した。これを8M尿素と20mM DTTを含む20mMリン酸ナトリウム、pH4.0で希釈し、変性酵素濃度を40mg/mlに調整した。この溶液0.2mlを、希釈用緩衝液（2mM DTTを含む20mM酢酸ナトリウム、pH4.0）10mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。希釈後の構造状態の変化過程を調べるため、Superdex 75 HR 10/30を用いたゲル濾過分析を行った。緩衝液には、0.02%のTween 20を含む0.1Mリン酸ナトリウム、pH4.0を用い、流速：0.8ml/minで行った。希釈後のサンプル

100 μ gを経時的（2、10、30、60、100、160及び260分、並びに1日）に分析した。希釈直後（2分）では、天然構造（状態）にある本酵素のピーク溶出時間より約4分早くピークが検出されたが、希釈後の時間経過と共に溶出時間が変化し、構造状態（分子の大きさや形）が希釈後に変化し続けていることが分かった。

一方、実施例 1 1 で得られた精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼを 0.16M 尿素と 2mM DTTを含む 20mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0 で 24 時間透析し、希釈用緩衝液中で十分に安定な構造を形成させた後、同様に分析した（図 1 2 参照。）。ピークの溶出時間は天然状態から変化せず、本酵素は 0.16M 尿素、pH 4.0 中であっても天然状態を失うことはなかった。希釈により形成された構造は、十分に時間が経過するとそのピーク溶出時間が天然構造と一致するものの、ピーク形状が依然として明確に異なった。これらの結果より、希釈により形成される中間状態は経時的にその構造状態を変化させ、最終的にも天然状態と同様の構造には到らず、構造形成の中間状態に留まることが分かった。

（実施例 1 4）

実施例 1 2 と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH 4.0 に調整した。これを 8M 尿素と 20 mM DTTを含む 20 mM リン酸ナトリウム、pH 4.0 で希釈し、変性酵素濃度を 15 mg/ml に調整した。この溶液 0.2 ml を、希釈用緩衝液（2mM DTTを含む 20mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0）10ml に希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。この溶液を 280nm で励起し、Trp 蛍光の λ_{\max} を経時的（30秒並びに 0.5、1、1.5 及び 2 時間）に測定した。希釈直後（30秒）より、経時的に λ_{\max} のブルーシフト（351.5 \rightarrow 344nm）が観察され、構造が徐々にコンパクト化していく（構造形成が進行する）過程が示された。また、希釈後十分な時間を経過しても、 λ_{\max} は天然状態のもの（340.0nm）とは一致せず、希釈により形成された構造状態が明らかに天然状態とは異なることを示した。

一方、実施例 1 1 で得られた精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼを 0.16M 尿素と 2mM DTTを含む 20mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0 で 24 時間透析し、希釈用緩衝液中で十分に安定な構造を形成させた後、同様に Trp 蛍光の λ_{\max} を測定したところ、 λ_{\max} は天然状態と変わることなく、本酵素は 0.16M 尿素、pH 4.0 中であっても天然構造（状態）を維持することが分かった（表 4 参照。）。これら

の結果から、希釈により形成される中間状態は経時的にその構造状態を変化させ、最終的にも天然状態と同様の構造には到らず、構造形成の中間状態に留まることが分かった。

[表 4]

保持時間	λ_{\max} (nm)
30S	351.5
0.5h	346.5
1h	346.0
1.5h	345.0
2h	341.5
天然型 (透析後)	340.0

(実施例 15)

実施例12と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH4.0に調整した。これを8M 尿素と20 mM DTTを含む20mM リン酸ナトリウム、pH4.0で希釈し、変性酵素濃度を15mg/mlに調整した。この溶液0.2 mlとANS（8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸、最終濃度20 μ M）を、希釈用緩衝液（2mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH4.2）10mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化した。その後のANS蛍光強度を励起波長400nm、蛍光波長470nmで経時的（1分並びに0.5、1、1.5及び2時間）に測定し、結果を表5に示した。この結果、希釈直後（1分）から2時間まで、経時的な蛍光強度の低下（1387→974）が観察され、タンパク質表面に露出した疎水性領域が徐々に消失していく過程が示された。しかし、希釈後に十分な時間が経過しても、ANS蛍光強度は天然状態の蛍光強度にまで低下せず、希釈により形成された構造状態が明らかに天然状態とは異なることを示した。

一方、実施例11で得られた精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼを0.16M 尿素と2mM DTTを含む20mM 酢酸ナトリウム、pH4.2で24時間透析し、希釈用緩衝液中で十分に安定な構造を形成させた後、同様にANS蛍光強度を測定し

たところ、蛍光強度は天然状態と比較して若干上昇するものの、その変化は極わずかであり（56→162）、本酵素は0.16M 尿素、pH4.2中にあっても天然状態を維持することが分かった。これらの結果から、希釈により形成される中間状態は経時的にその構造状態を変化させ、最終的にも天然状態と同様の構造には到らず、構造形成の中間状態に留まることが分かった。

[表 5]

保持時間	ANS蛍光強度
1min	1387
0.5h	1119
1h	1013
1.5h	955
2h	974
天然型 (透析後)	162

(実施例 16)

実施例 12と同様に調製された変性酵素液に濃塩酸を滴下し、pH4.0に調整した。これを8M 尿素と20 mM DTTを含む20mM リン酸ナトリウム、pH4.0で希釈し、変性酵素濃度を40mg/mlに調整した。この溶液0.2mlを、希釈用緩衝液（2mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH4.0）10 mlに希釈注入し、直ちに攪拌均一化し、native PAGEを行った。泳動は、市販のNuPAGE Tris-Acetate 7%ゲル（Novex社）を用い、His-Mes、pH6.1の緩衝液システムで行った。図13にその結果を示す。希釈後の本酵素は天然状態とは明らかに異なる易動度を示し、希釈により形成された構造状態が天然状態とは異なることを示した。

同時に、実施例 11で得られた精製遺伝子組み換え型トランスグルタミナーゼに尿素と酢酸ナトリウム水溶液を加え、最終的に0.16M 尿素と2 mM DTTを含む20 mM 酢酸ナトリウム、pH4.0に調整し、同様にnative-PAGEを行ったところ、溶媒組成変化の前後で易動度に変化なく、本酵素は0.16M 尿素、pH4.2中にあ

っても天然状態を維持することが分かった。

実施例 11～16 に示した結果から、(1) 水性媒体中、酸性下において変性剤の希釈により形成される構造状態が複雑な混合物であり、(2) その状態は経時的に変化し、(3) 最終的にも天然構造とは異なる“中間状態”に留まることを示している。更に、実施例 9 と 10 は(4) 希釈条件を適切に設定して好ましい中間状態を誘導することにより、天然状態への回収率向上が可能であることを示している。

発明の効果

本発明で使用する前記リフォールディング法によれば遺伝子組み換え微生物により生産されるような変性した状態で得られた本酵素を、天然状態のトランスグルタミナーゼと実質的に同等の酵素活性、即ちトランスグルタミナーゼ活性を有するトランスグルタミナーゼを工業的に、しかも極めて高純度に製造することができ、故に更に精製する必要もなくそのまま食品等各種の分野で広く天然状態のトランスグルタミナーゼと同様に使用することが可能である。

特に、酸性溶液中における希釈、好ましくは pH 値をほぼ一定にした状態での希釈処理及びその後の中性領域への調整により、変性した状態にあるトランスグルタミナーゼから、前記構造形成の中間構造を経てその目的とする高次構造形成を効率よく促進し目的とする酵素活性を有する酵素を製造することができる。

前記構造形成の中間構造を有する中間体も提供する。

請 求 の 範 囲

1. 変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを少なくとも下記 (a) 及び (b) 工程を含む工程に付することを特徴とする酵素活性を有するトランスグルタミナーゼの製造方法:

(a) 当該変性した状態にある酵素を水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめるようにする工程; 及び

(b) 前記構造形成の中間構造を形成した酵素を、水性媒体中 pH 値が中性領域下で酵素活性を有する状態の高次構造を形成せしめるようにする工程。

2. (a) 工程において当該酵素の分子内のシステイン残基のチオール基が遊離形であり、水性媒体中、酸性下において酵素活性を有する状態への構造形成の中間構造を形成せしめる際に、当該酵素が溶解した状態で酸性下に希釈される請求の範囲 1 記載の方法。

3. (b) 工程において、水性媒体が酵素活性を有する状態の高次構造を形成する促進剤を含有する請求の範囲 1 記載の方法。

4. (b) 工程後に、(c) 当該酵素のうち不活性な酵素を会合凝集物として分離する工程を含む請求の範囲 1 記載の方法。

5. (a) 工程において、当該酵素が当該水性媒体中に溶解しており、(b) 工程において、当該中性領域が、当該 (a) 工程で得られた酵素溶液の pH 値を上昇せしめて中性領域とした領域である請求の範囲 1 記載の方法。

6. 当該 (a) 工程において、当該変性した状態にある酵素の酸性溶液を酸性下に希釈するに際して 15℃以下の低温下で希釈され、希釈されたタンパク質濃度が 10 mg/ml 未満である請求の範囲 2 記載の方法。

7. (a) 工程において、水性媒体がタンパク質変性剤を含有する請求の範囲 1 記載の方法。

8. 前記構造形成の中間構造が、近紫外領域の CD スペクトルにおいて天然状態のものに対して 30～70% の分子楕円率を有する請求の範囲 1 記載の方法。

9. 変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを、水性媒体中酸性下に溶解せしめ、その後当該酵素溶液を中性領域に調整して酵素活性を有する状態にある酵素を生成せしめることを特徴とする酵素活性を有するトランスグルタミナーゼの製造方法。

10. 変性した状態にあるトランスグルタミナーゼを水性媒体中酸性下におくことにより得ることができ、以下の性質 (d)～(g) を示すことを特徴とするタンパク質：

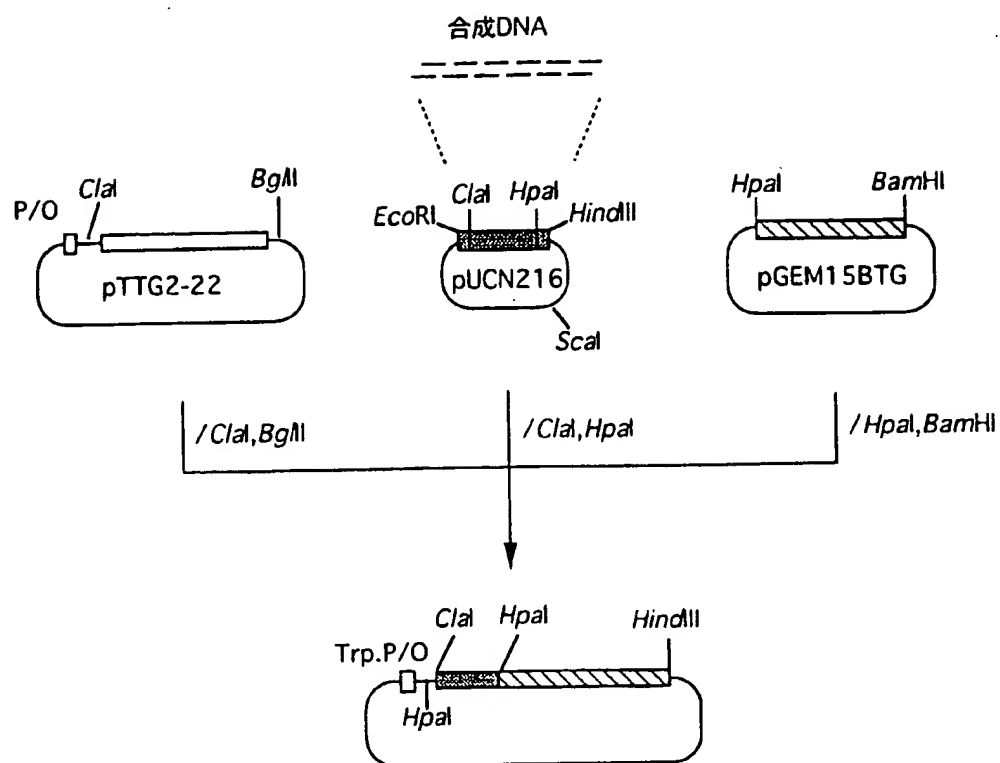
(d) ハイドロキサメート法によるトランスグルタミナーゼの活性測定により 15～25 U/mg の比活性を有し；

(e) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で 36,000～40,000 の分子量を有し；

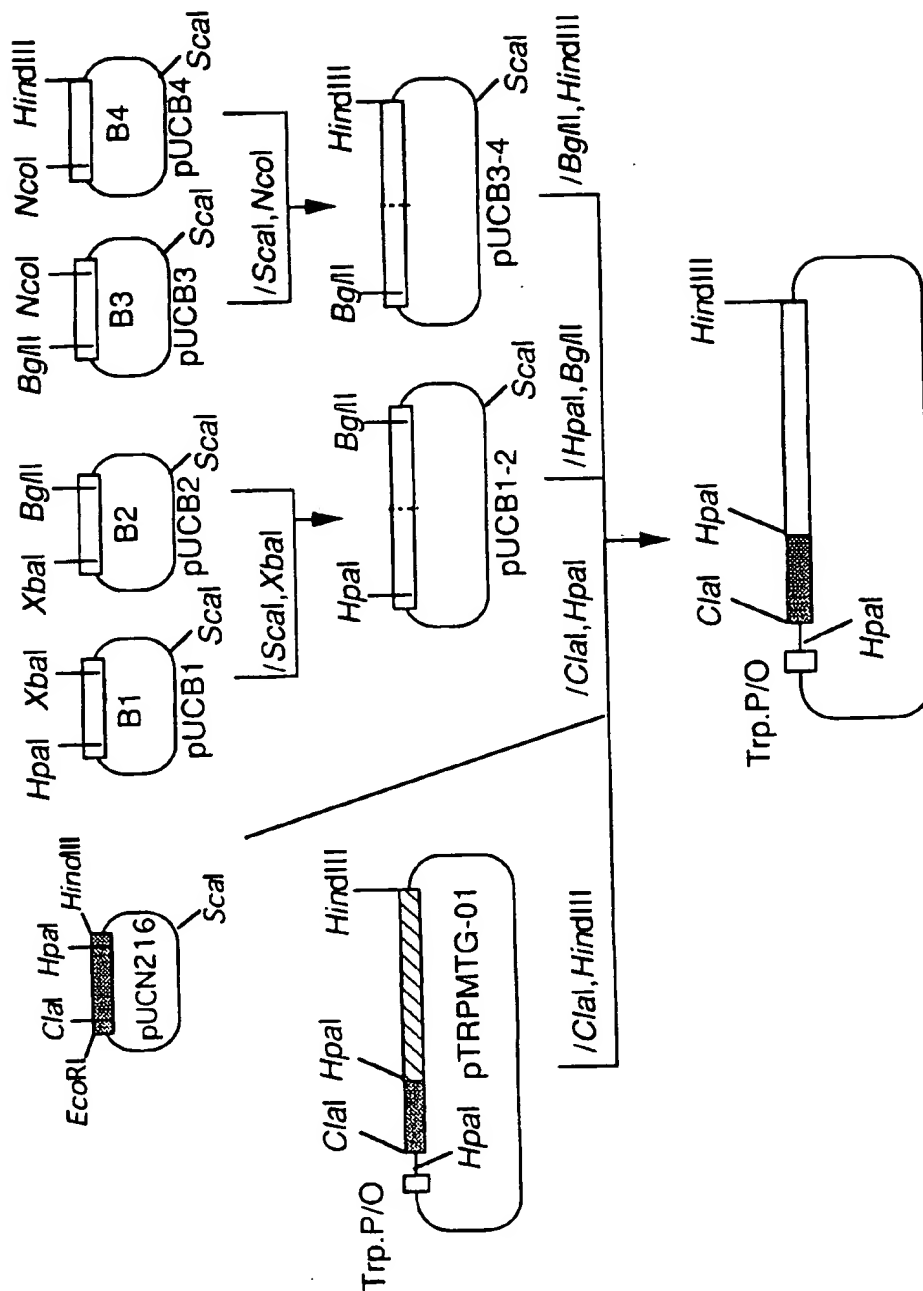
(f) 近紫外領域の CD スペクトルにおいて天然状態のものに対して 30～70% の分子楕円率を有し；及び

(g) His-Mes、pH6.1 の緩衝液システムで行う native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法において天然状態のものより遅い移動度を示す。

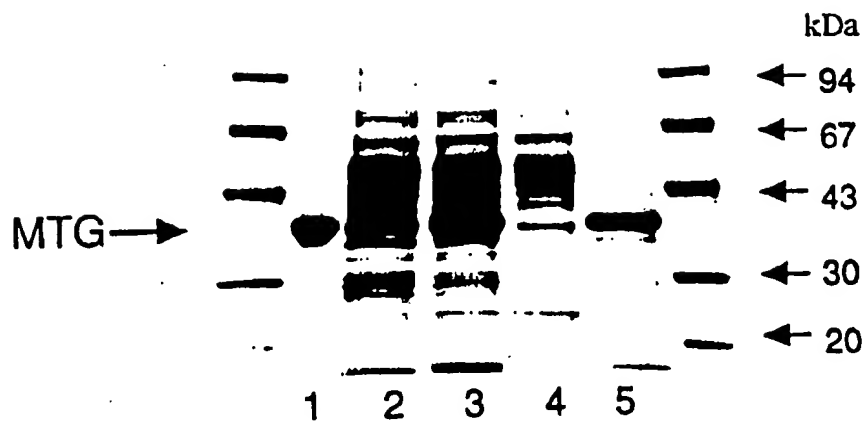
【図1】



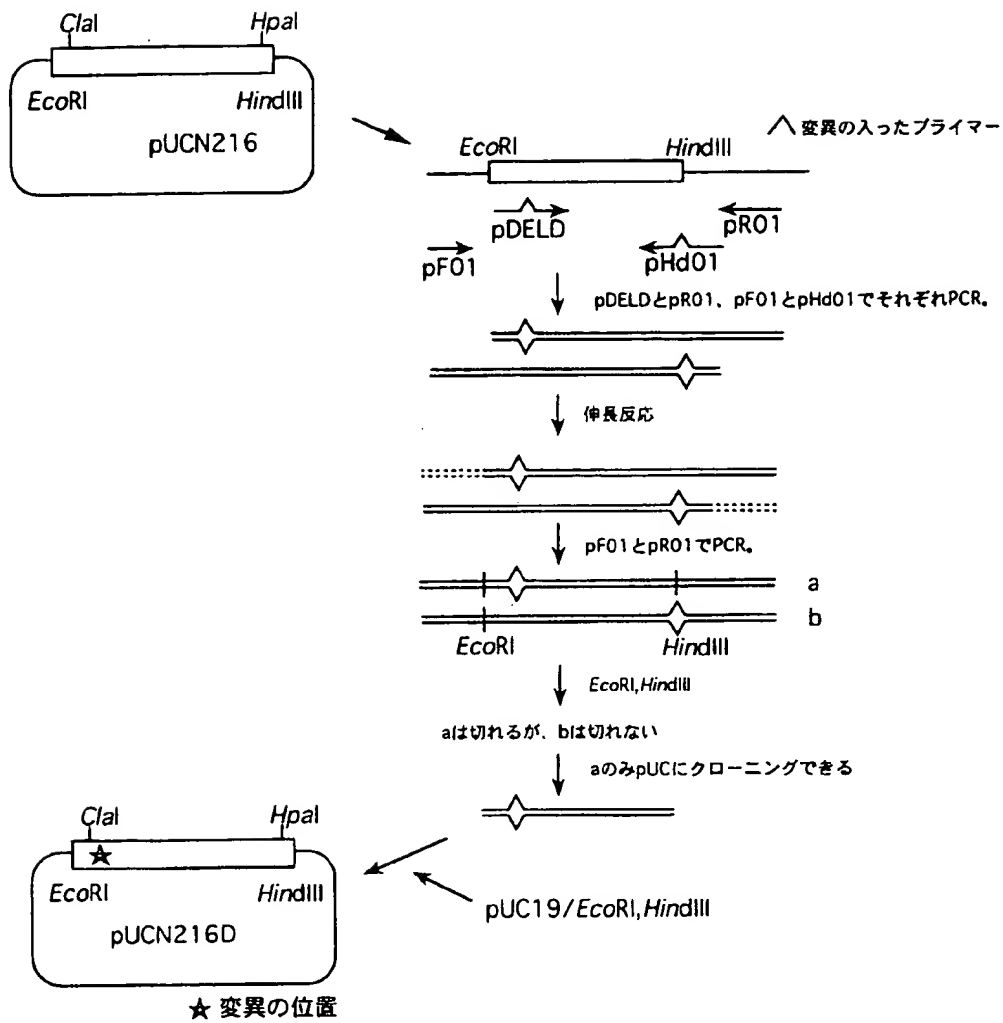
【図2】



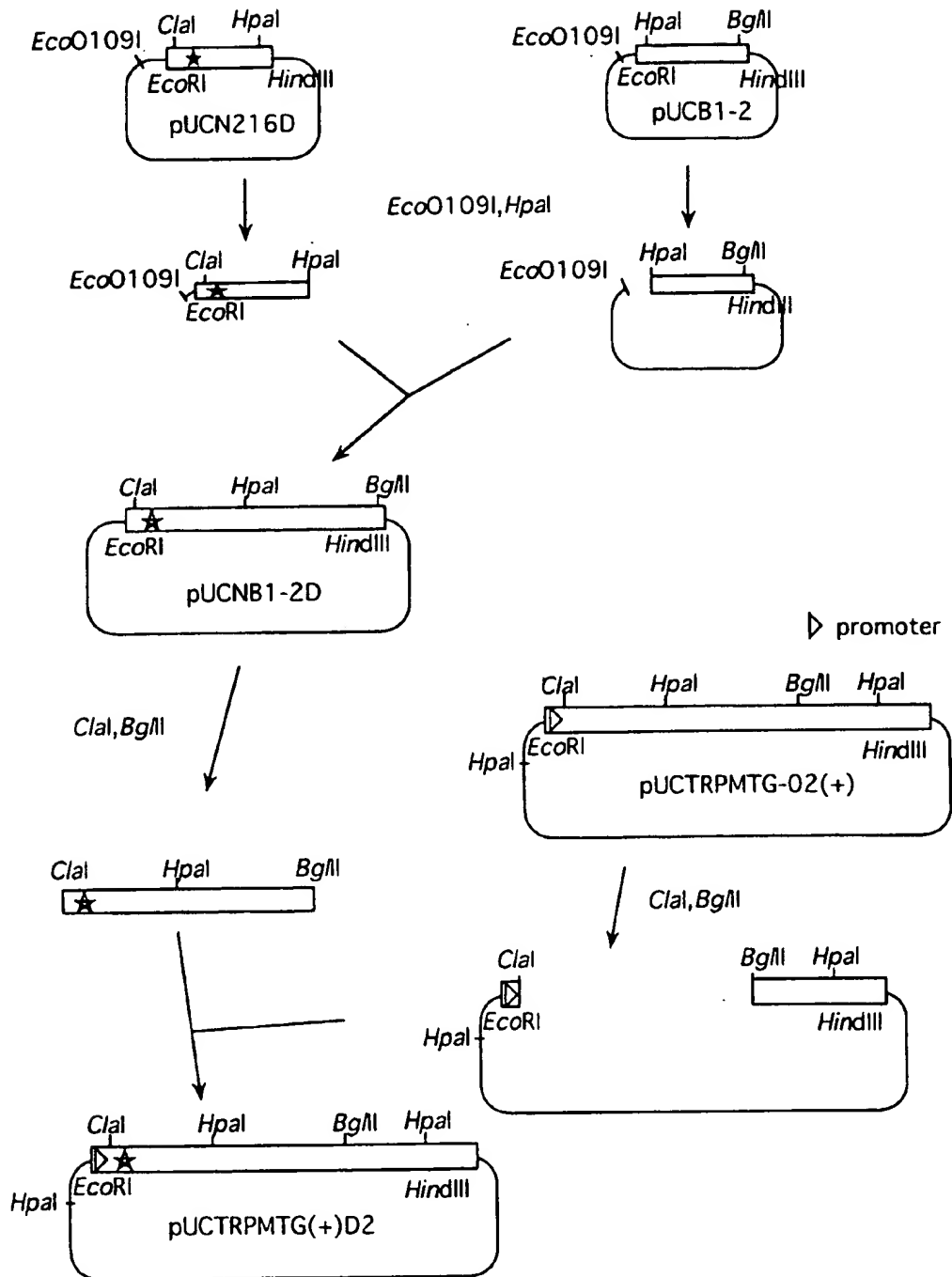
【図3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

pUCTRPMTG(+)02 : ...TTTAAATGGATTCTGACGAT...

M D S D D

pUCTRPMTG(+)D2 : ...TTTAAATG---TCTGACGAT...

M S D D

天然型 MTG : D S D D

-は欠失塩基

【図 7】

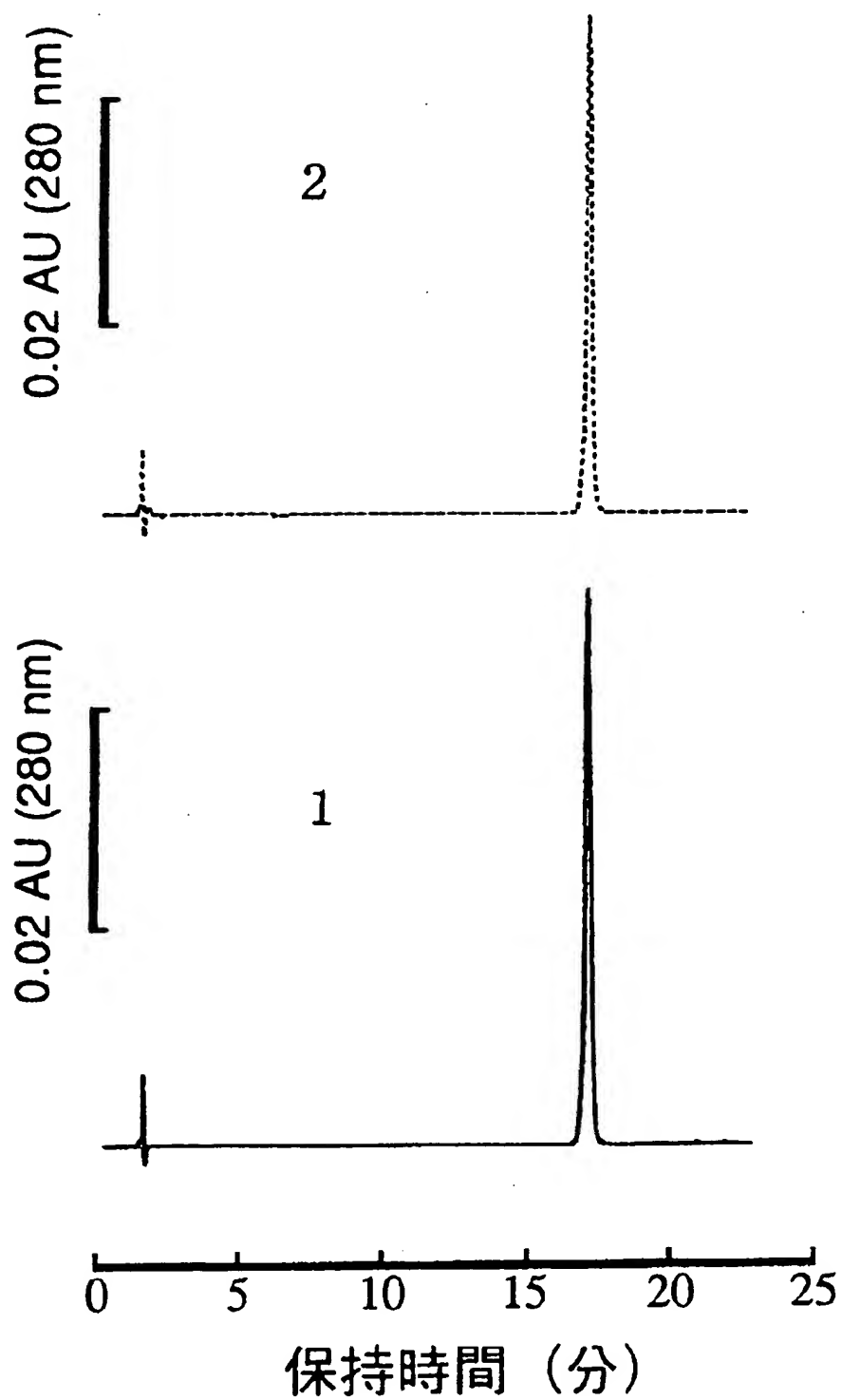
pUCTRPMTG(+)D2 による MTG : SDDRV.....

参考

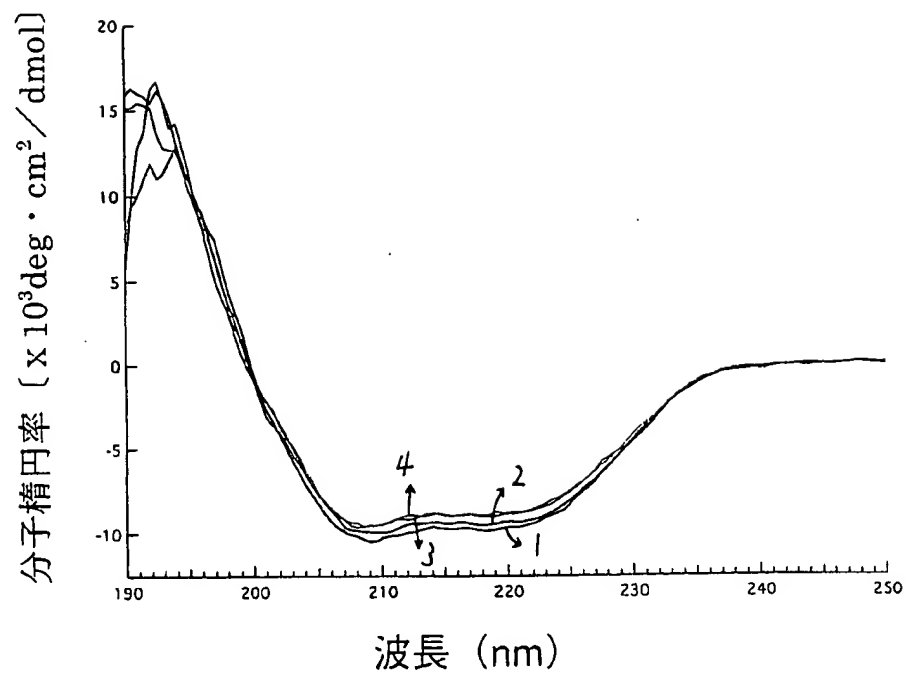
天然型 MTG : DSDDRV.....

pUCTRPMTG(+)02 による MTG : MDSDDRV.....

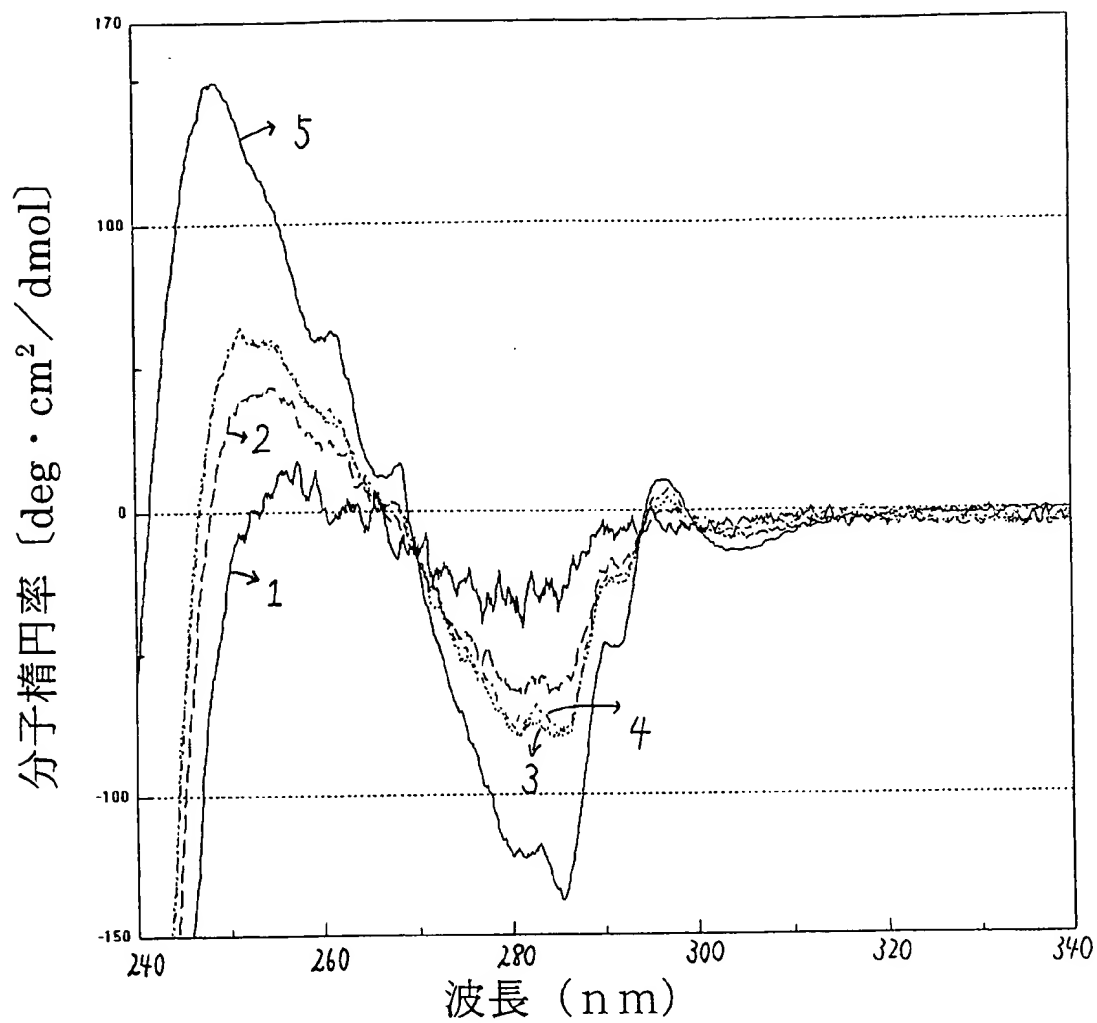
【図 8】



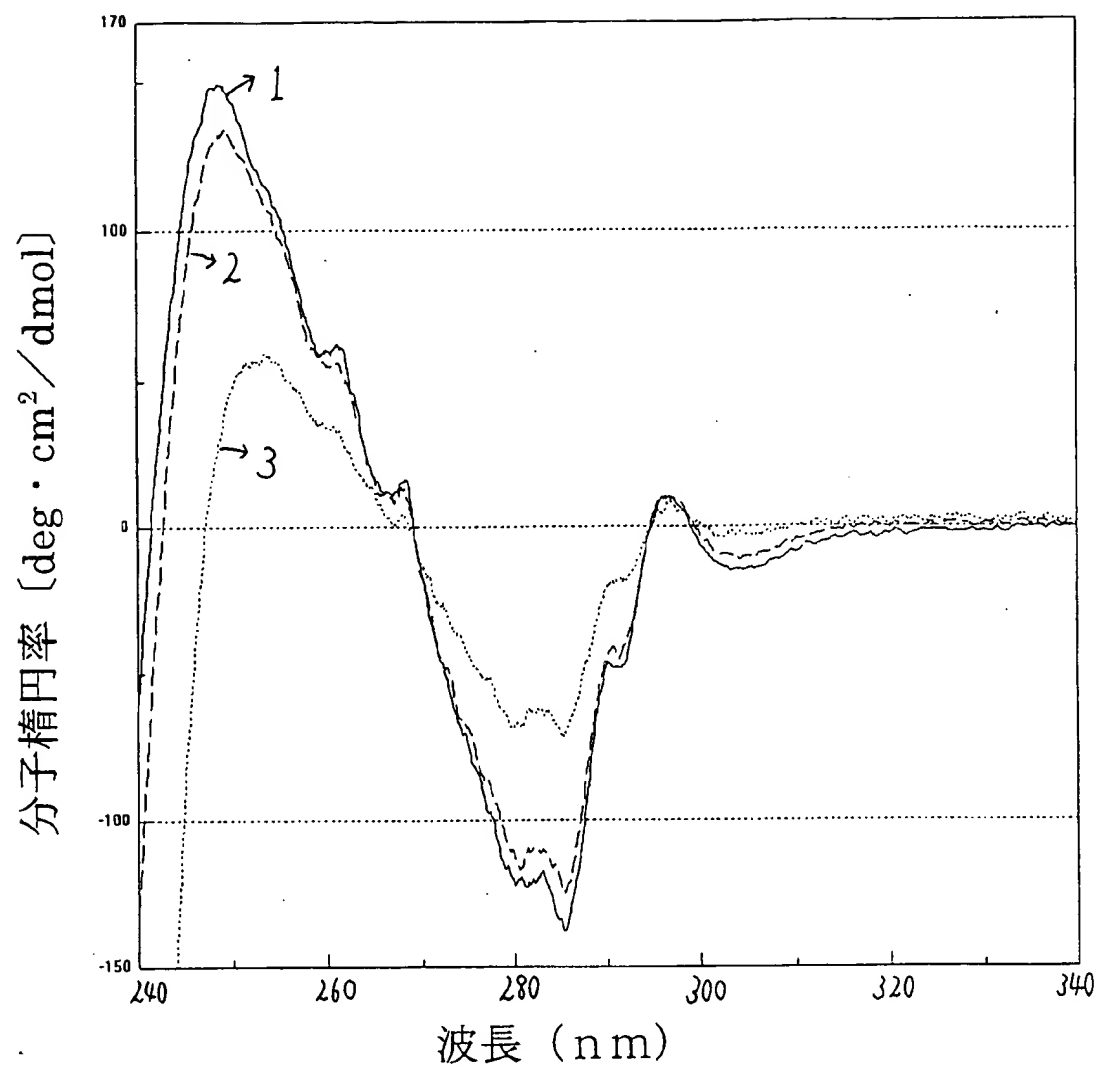
【図9】

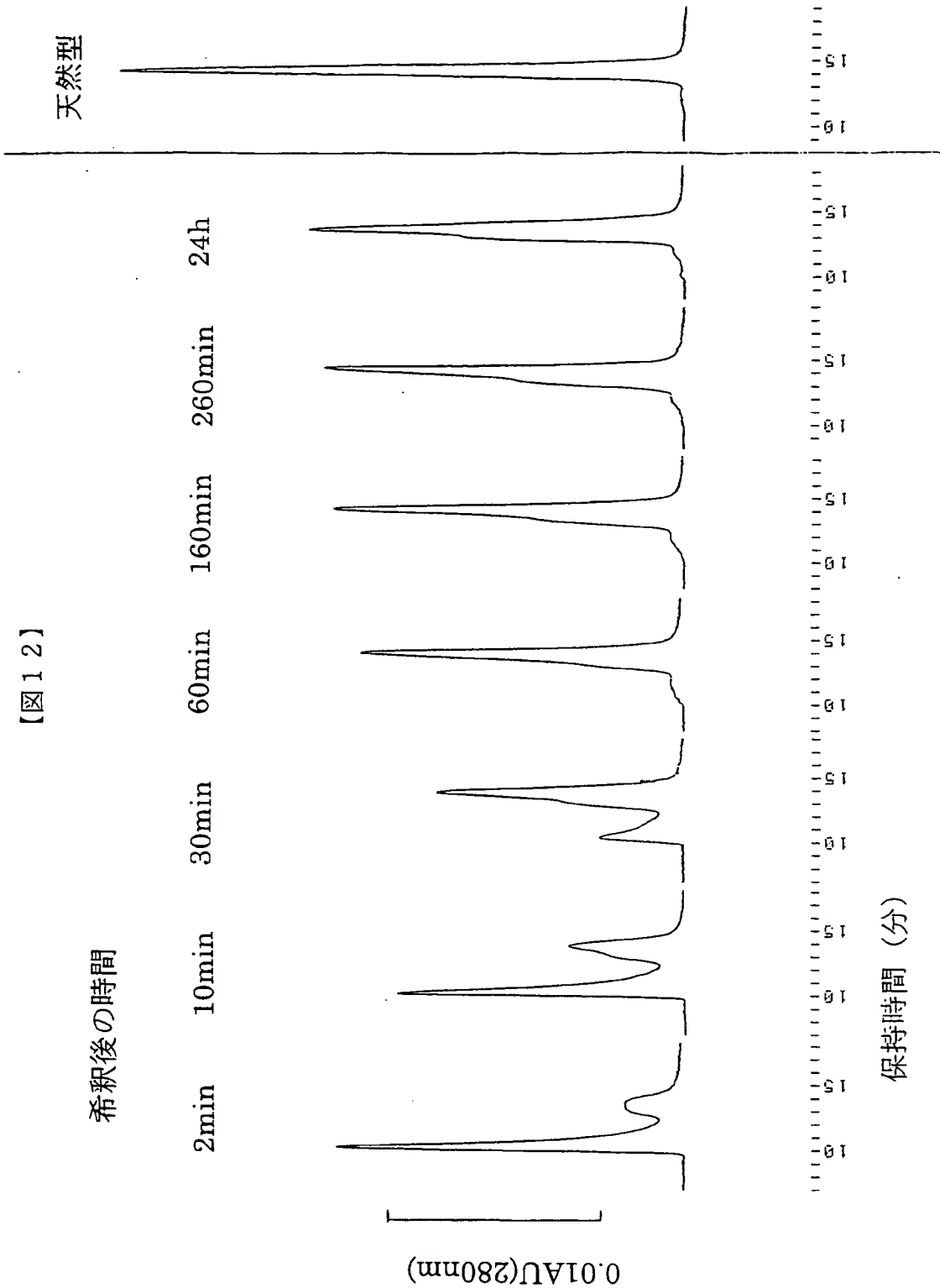


【図10】



【図 11】

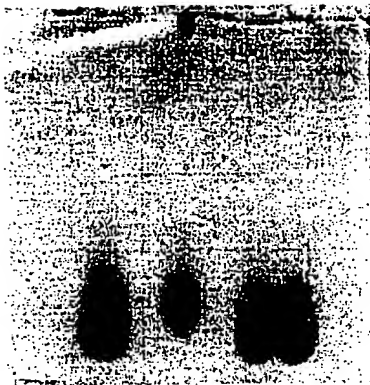




【図12】

日本国特許庁 14.01.00

【図 13】



1 2 3 4

配 列 表
(SEQUENCE LISTING)

<110> 味の素株式会社

(AJINOMOTO CO., INC.)

横山 敬一

(YOKOYAMA, Keiichi)

小野 邦夫

(ONO, Kunio)

江島 大輔

(EJIMA, Daisuke)

<120> トランスグルタミナーゼの製造方法

(Process for Production of Transglutaminase)

<130> P2626PCT-AJ

<150> JP 平成10年特許願第373131号 (10-373131)

<151> 1998年12月28日 (28. 12. 98)

<160> 57

<210> 1

<211> 1518

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<220>

<221> CDS

<222> (87).. (1082)

<400> 1

```

ttccctgtt gacaattaat catcgaacta gttaactagt acgcaagttc acgtaaaaag      60
ggatcgcatt agtaaggagg tttaaa atg gat tct gac gat cgt gtt act cca      113
                               Met Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro
                               1             5

cca gct gaa cca ctg gat cgt atg cca gat cca tat cgt cca tct tat      161
Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr
   10             15             20             25

ggc cgt gct gaa act gtt gtt aat aat tat att cgt aaa tgg caa caa      209
Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln
           30             35             40

gtt tat tct cat cgt gat ggt cgt aaa caa caa atg act gaa gaa caa      257
Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln
           45             50             55

cgt gaa tgg ctg tct tat ggt tgc gtt ggt gtt act tgg gtt aac tct      305
Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser
           60             65             70

ggc cag tat ccg act aac cgt ctg gca ttc gct tcc ttc gat gaa gat      353
Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp
           75             80             85

cgt ttc aag aac gaa ctg aag aac ggt cgt ccg cgt tct ggt gaa act      401
Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr
           90             95             100             105

cgt gct gaa ttc gaa ggt cgt gtt gct aag gaa tcc ttc gat gaa gag      449

```

Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu	
110 115 120	
aaa ggc ttc cag cgt gct cgt gaa gtt gct tct gtt atg aac cgt gct	497
Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala	
125 130 135	
cta gag aac gct cat gat gaa tct gct tac ctg gat aac ctg aag aag	545
Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys	
140 145 150	
gaa ctg gct aac ggt aac gat gct ctg cgt aac gaa gat gct cgt tct	593
Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser	
155 160 165	
ccg ttc tac tct gct ctg cgt aac act ccg tcc ttc aaa gaa cgt aac	641
Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn	
170 175 180 185	
ggt ggt aac cat gat ccg tct cgt atg aaa gct gtt atc tac tct aaa	689
Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys	
190 195 200	
cat ttc tgg tct ggt cag gat aga tct tct tct gct gat aaa cgt aaa	737
His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys	
205 210 215	
tac ggt gat ccg gat gca ttc cgt ccg gct ccg ggt act ggt ctg gta	785
Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val	
220 225 230	
gac atg tct cgt gat cgt aac atc ccg cgt tct ccg act tct ccg ggt	833
Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly	
235 240 245	
gaa ggc ttc gtt aac ttc gat tac ggt tgg ttc ggt gct cag act gaa	881
Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu	
250 255 260 265	

gct gat gct gat aag act gta tgg acc cat ggt aac cat tac cat gct 929
 Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala
 270 275 280
 ccg aac ggt tct ctg ggt gct atg cat gta tac gaa tct aaa ttc cgt 977
 Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg
 285 290 295
 aac tgg tct gaa ggt tac tct gac ttc gat cgt ggt gct tac gtt atc 1025
 Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile
 300 305 310
 acc ttc att ccg aaa tct tgg aac act gct ccg gac aaa gtt aaa cag 1073
 Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln
 315 320 325
 ggt tgg ccg taatgaaagc ttggatctct aattactgga cttcacacag actaaaatag 1131
 Gly Trp Pro
 330
 acatatctta tattatgtga ttttgtgaca tttcctagat gtgaggtgga ggtgatgtat 1191
 aaggtagatg atgatactct acgccggacg catcgtggcc ggcataccg gcgccacagg 1251
 tgcggttgct ggccctata tcgccgacat caccgatggg gaagatcggg ctgcgcactt 1311
 cgggctcatg agcgcttggt tcggcggtggg tatggtggca ggccccgtgg ccggggggact 1371
 gttgggggcc atctccttgc atgcaccatt ccttgcggcg gcggtgctca acggcctcaa 1431
 cctactactg ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gagagcccgc 1491
 ctaatgagcg ggcttttttt tcagctg 1518

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 2

aattcatcga ttagtaagga ggtttaaaat ggattctga

39

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 3

cgatcgtcag aatccatttt aaacctcctt actaatcgat g

41

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 4

cgatcgtgtt actccaccag ctgaaccact ggatcgtatg c

41

<210> 5

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 5

gatctggcat acgatccagt ggttcagctg gtggagtaac a

41

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 6

cagatccata tcgtccatct tatggtcgtg ctgaaactgt t

41

<210> 7

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 7

attaacaaca gtttcagcac gaccataaga tggacgatat g

41

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 8

gttaataatt atattcgtaa atggcaacaa gtttattctc a

41

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 9

tcacgatgag aataaacttg ttgccattta cgaatataat t

41

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 10

tcgtgatggt cgtaaacaac aaatgactga agaacaacgt g

41

<210> 11

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 11

gccattcacg ttgttcttca gtcatttgtt gtttacgacc a

41

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 12

aatggctgtc ttatggttgc gttggtgtta ctggggttaa ca

42

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 13

agcttggttaa cccaagtaac accaacgcaa ccataagaca

40

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 14

aattcggttaa ctctgggtcag tatccgacta accgtctg

38

<210> 15

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 15

cgaatgccag acggttagtc ggatactgac cagagttaac g

41

<210> 16

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 16

gcattcgctt ccttcgatga agatcgtttc aagaacgaac tgaagaacg

49

<210> 17

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 17

ggacgaccgt tcttcagttc gttcttgaaa cgatcttcat cgaaggaag

49

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 18

gtcgtccgcg ttctggtgaa actcgtgctg aattc

35

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 19

gaccttcgaa ttcagcacga gtttcaccag aacgc

35

<210> 20

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 20

gaaggtcgtg ttgctaagga atccttcgat gaagagaaag gcttccag

48

<210> 21

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 21

gagcagctg gaagccttc tcttcacga aggattcctt agcaacac

48

<210> 22

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 22

cgtgctcgtg aagttgcttc tggtatgaac cgtgctctag aa

42

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 23

agctttctag agcacggttc ataacagaag caacttcac

39

<210> 24

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 24

aattctctag agaacgctca tgatgaatct gcttaccitgg ataac

45

<210> 25

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 25

cttcttcagg ttatccaggt aagcagattc atcatgagcg ttctctagag

50

<210> 26

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 26

ctgaagaagg aactggctaa cggtaacgat gctctgcgta acgaagatg 49

<210> 27

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 27

gagaacgagc atcttcgtta cgcagagcat cgttaccgtt agccagttc 49

<210> 28

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 28

ctcgtctctc gttctactct gctctgcgta acatccgctc 40

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 29

ctttgaagga cggagtgtta cgcagagcag agtagaacg

39

<210> 30

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 30

cttcaaagaa cgtaacgggtg gtaaccatga tccgtctcgt atgaaag

47

<210> 31

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 31

gataacagct ttcatacgag acggatcatg gttaccaccg ttacgtt

47

<210> 32

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 32

ctgttatcta ctctaaacat ttctggtctg gtcaggatag atcta

45

<210> 33

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 33

agcttagatc ttcctgacc agaccagaaa tgittagagt a

41

<210> 34

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 34

aattcagatc ttcttctgct gataaacgta aatacggtaga tc

42

<210> 35

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 35

catccggatc accgtattta cgtttatcag cagaagaaga tctg

44

<210> 36

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 36

cggatgcatt ccgtccggct ccgggtactg gtctggtaga catgtctc

48

<210> 37

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 37

gatacagaga catgtctacc agaccagtac ccggagccgg acggaatg

48

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 38

gtgatcgtaa catcccggt tctccgactt ctccg

35

<210> 39

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 39

cttcacccgg agaagtcgga gaacgcggga tgttac

36

<210> 40

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 40

ggatgaaggct tcgttaactt cgattacggt tggttcggtg

40

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 41

gtctgagcac cgaaccaacc gtaatcgaag ttaacgaagc

40

<210> 42

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 42

ctcagactga agctgatgct gataagactg tatggacca tgga

44

<210> 43

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 43

agcttccatg ggtccataca gtcttatcag catcagcttc a

41

<210> 44

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 44

aattcccatg gtaaccatta ccatgctccg aacggttct

39

<210> 45

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 45

caccagaga accgttcgga gcatggtaat ggtaccatg gg

42

<210> 46

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 46

ctgggtgcta tgcatgtata cgaatctaaa ttccgtaact g

41

<210> 47

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 47

cttcagacca gttacggaat ttagattcgt atacatgcat ag

42

<210> 48

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 48

gtctgaaggt tactctgact tcgacgtgg tgcttac

37

<210> 49

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 49

gtgataacgt aagcaccacg atcgaagtca gagtaac

37

<210> 50

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 50

gttatcacct tcattccgaa atcttggaac actgcgcc

38

<210> 51

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 51

ctttgtccgg agcagtggtc caagatttcg gaatgaag

38

<210> 52

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 52

ggacaaagtt aaacagggtt ggccgtaatg aaagccta

38

<210> 53

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 53

agcttaagct ttcattacgg ccaaccctgt ttaa

34

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 54

ttttcccagt cacgacgttg

20

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 55

caggaaacag ctatgaccat g

21

<210> 56

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 56

taaggagggt taaaatgtct gacgatcgtg ttactc

36

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA

<400> 57

tacgccaaagg ttgttaaccc a

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 9/10 // C12N 15/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 9/00-99, C12N 15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	EP, 889133, A2 (AJINOMOTO CO. INC.), 07 January, 1999 (07.01.99) & US, 6013498, A & CA, 2237041, A & JP, 11-075876, A	1-10
Y	Biosic.Biotechnol.Biochem.(1997), Vol.61, No.5, p.830-835, Kawai M. et al., "High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from streptovercillium in Escherichia coli"	1-10
Y	Katsuhide Aburatani et al., "Oyo Kagaku Koza 11 "Tanpakushitsu kogaku"", Kabushiki Kaisha Asakura Shoten, (20.11.91), pages 52-54, 60-64	1-10
PY	Biotechnol.Bioeng.(05.02.99), Vol.62, No.3, p.301-310, Ejima D. et al., "High yield refolding and purification process for recombinant human interleukin-6 expressed in Escherichia coli"	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 March, 2000 (28.03.00)

Date of mailing of the international search report
18 April, 2000 (18.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 99/07250	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl ¹ C 12 N 9/10 // C 12 N 15/54			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl ¹ C 12 N 9/00~99, C 12 N 15/00~90			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
P Y	EP, 889133, A2 (AJINOMOTO CO. INC.) 7.1月.1999 (07.01.99) & US, 6013498, A & CA, 2237041, A & JP, 11-075876, A		1-10
Y	Biosic. Biotechnol. Biochem. (1997), Vol. 61, No. 5, p. 830-835, Kawai M. et al., "High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from streptovercillium in Escherichia coli"		1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 28.03.00		国際調査報告の発送日 18.04.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 真由美 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	油谷 克英 他, “応用化学講座 11 「蛋白質工学」”, 株式会社 朝倉書店, (20. 11. 91), 第52頁～第54頁, 第60頁～第64頁	1-10
P Y	Biotechnol. Bioeng. (05. 02. 99), Vol. 62 , No. 3 , p. 301-310, Ejima D. et al., “High yield refolding and purification process for recombinant human interleukin-6 expressed in Escherichia coli”	1-10